

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：15101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2021

課題番号：19K24032

研究課題名(和文) 活性型エンハンサーを分子標的として用いる子宮内膜症の組織診断マーカー遺伝子の探索

研究課題名(英文) Searching for diagnostic markers of endometriosis using active enhancers as target

研究代表者

伊澤 正郎 (IZAWA, Masao)

鳥取大学・医学部・プロジェクト研究員

研究者番号：50032222

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：子宮内膜症病変組織に特徴的なゲノムDNAメチル化修飾と遺伝子発現との関連が示唆される。本研究は、病変組織における診断マーカー遺伝子の探索を目標に、病変組織で活性化した遺伝子発現を駆動するエンハンサーの検証を計画した。しかし、COVID-19環境下における研究の制約により当初計画を変更し、子宮内膜症細胞に特徴的な遺伝子発現の検証にシフトした。RNA-seq解析により、子宮内膜症病変組織における遺伝子発現の多様性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

子宮内膜症は、低エストロゲン状態の誘起を目的とするホルモン製剤治療が第一選択とされるが、治療成績には限界がある。その背景として、子宮内膜症の病変組織に特徴的な遺伝子発現の影響を想定し、本研究を実施した。子宮内膜症細胞の遺伝子発現状況を検証した結果、病変組織における遺伝子発現の多様性が示唆された。この成績は、ホルモン製剤治療の限界克服に向けた次段階の研究へつなぐ有用な知見である。

研究成果の概要(英文)：The genomic DNA methylation characteristic of endometriosis lesion has been suggested to associate with gene expression. In the hope of searching for diagnostic marker genes in endometriotic lesions, we planned to verify enhancers that actively drive gene expression in endometriotic lesions. However, due to research restrictions under the COVID-19 environment, the initial plan was changed and shifted to verify the gene expressions characteristic in endometriotic cells. RNA-seq analysis suggested a diversity of gene expressions in endometriotic lesions.

研究分野：分子内分泌学 ステロイド病態学 エピゲノム病態学 生殖内分泌学 子宮内膜症

キーワード：子宮内膜症 エピゲノム病態 エストロゲン病態 遺伝子発現病態

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

先行研究により(Izawa M *et al.* 2008, 2011, 2013, 2014)、子宮内膜症病変組織に特徴的なゲノムDNAメチル化修飾と遺伝子発現との関連が示唆された。その検証の第1段階として実施した網羅的DNAメチル化アレイ解析により、GATA6遺伝子を含む93遺伝子の1,811箇所に子宮内膜症細胞に特徴的なメチル化修飾を同定した(Izawa M *et al.* 2014, 2019)。GATA6遺伝子に見出したハイポメチル化領域に着目してシス機能を検証した結果、活性型エンハンサーであることが判明した(Izawa M *et al.* 2019)。この成績は、子宮内膜症病変組織に特徴的なゲノムDNAのメチル化環境により活性化したエンハンサーによる遺伝子発現を示唆する。

2. 研究の目的

本研究は、病変組織における診断マーカー遺伝子の探索を目標に、病変組織で活性化した遺伝子発現を駆動する活性型エンハンサーに着目し、その実体の検証を計画した。しかし、COVID-19環境下における研究制約により当初計画を変更し、RNA-seq解析を用いた子宮内膜症細胞に特徴的な遺伝子発現の検証に研究計画をシフトした。本研究で得られる成績は、次段階で実施予定の当初計画のための有用な基盤情報となる。

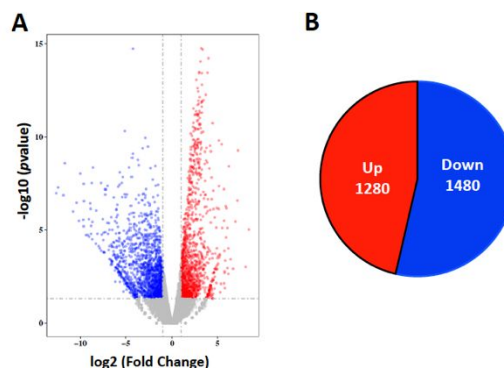
3. 研究の方法

正所性子宮内膜細胞と卵巣チョコレート嚢胞由来子宮内膜症細胞を用いた。RNA-seq解析はAZENTAプロトコールに準じた(NovaSeq, DNBSEQ-G400, 20M paired-end(PE) reads and 2 x 150bp PE/sample)。子宮内膜症細胞のエストロゲン応答性遺伝子解析には、10nM エストラジオール処理8時間の細胞RNAを用いた。エストロゲン応答性遺伝子はp-value <0.05とlog2 fold change>1の基準で抽出した(DESeq2 BP)。Principal component analysis(PCA)によりサンプル間距離を可視化した。

4. 研究成果

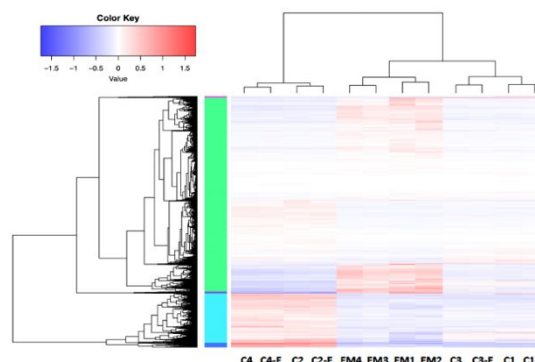
(1) RNA-seq解析(図1): 正所性子宮内膜症細胞と比較し、子宮内膜症細胞で発現亢進/発現抑制している2780遺伝子が検出された。図1Aは2780遺伝子のVolcano plot解析の結果。発現亢進されている遺伝子が1280(46%)、発現抑制されている遺伝子が1480(54%)であった(図1B)。

図1 RNA-seq 解析



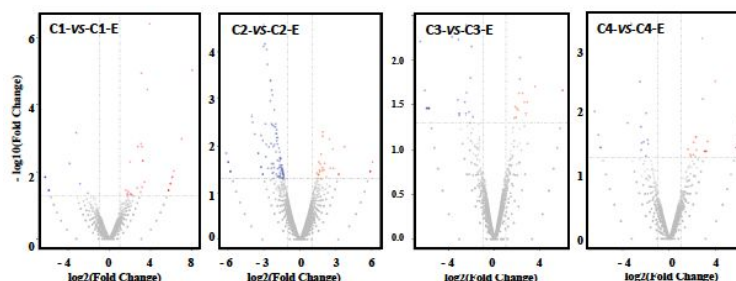
(2) 遺伝子発現のCluster 解析 (2780遺伝子)(図2): 子宮内膜細胞と比較し、子宮内膜症細胞の遺伝子発現状況は質的量的に大きく異なることが明らかとなった。同時に、検討した子宮内膜症細胞は遺伝子発現状況により2群であることが明らかとなった。

図2 Cluster 解析



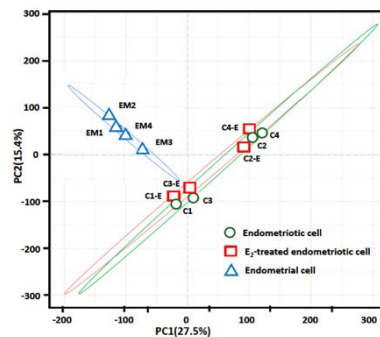
(3) 子宮内膜症細胞におけるエストロゲン応答性遺伝子発現のVolcano Plot解析結果(図3)。検討した4細胞でエストロゲン応答性遺伝子数は概ね同レベルであるが質的量的に異なることが明らかとなった。

図3
エストロゲン応答性遺伝子発現: VolcanoPlot解析



(4) Principal component analysis (PCA): 検討した子宮内膜症細胞は、子宮内膜細胞と異なる2種の細胞であることが明らかとなった。

図 4 PCA analysis



本研究により、子宮内膜症の病変組織における遺伝子発現の多様性が示唆された。子宮内膜症細胞によりエストロゲン応答性遺伝子発現の状況が質的量的に異なる。この観察は、先行研究 (Izawa M *et al.* 2008, 2011, 2013, 2014, 2019) により示唆された、「子宮内膜症病変組織に特徴的なゲノムDNAメチル化修飾と遺伝子発現との関連」の背景を示唆する観察と思われる。これらの成績は、子宮内膜症治療の第一選択とされるホルモン製剤治療の限界克服に向けた研究の有用な基盤情報である。

< 引用文献 >

1. Izawa M, Harada T, Taniguchi F, Ohama Y, Takenaka Y, and Terakawa N: An epigenetic disorder may cause aberrant expression of aromatase gene in endometriotic stromal cells. *Fertil Steril* 2008; 89:1390-6.
2. Izawa M, Taniguchi F, Uegaki T, Takai E, Iwabe T, Terakawa N, Harada T: Demethylation of a nonpromoter cytosine-phosphate-guanine island in the aromatase gene may cause the aberrant up-regulation in endometriotic tissues. *Fertil Steril* 2011; 95:33-9.
3. Izawa M, Taniguchi F, Terakawa N, and Harada T: Epigenetic aberration of gene expression in endometriosis. *Front Biosci* (Elite Ed) 2013; 5: 900-10.
4. Izawa M, Taniguchi F, Terakawa N, and Harada T: Epigenetics in endometriosis. (Endometriosis-pathogenesis and treatment, Springer) 2014 (107-23)
5. Izawa M, Taniguchi F, Harada T. GATA6 expression promoted by an active enhancer may become a molecular marker in endometriosis lesions. *Am J Reprod Immunol* 2019;e13078.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 伊澤正郎, 谷口文紀, 原田省	4. 巻 41
2. 論文標題 子宮内膜症細胞に特徴的な低メチル化により活性化されたGATA6遺伝子エンハンサー	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本エンドメトリオーシス学会誌	6. 最初と最後の頁 157-159
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Masao Izawa, Yukihiro Azuma, Naohiro Hori, Fuminori Taniguchi, Tasuku Harada	4. 巻 4 supplement-1
2. 論文標題 Estrogen-Responsive and -Unresponsive Gene Expressions Promoted by Enhancers Specifically Hypomethylated in Endometriotic Cells May Become a Molecular Marker in Endometriosis Lesions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Endocr Soc	6. 最初と最後の頁 A292
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/jendso/bvaa046.576	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Izawa M, Azuma Y, Taniguchi F, Harada T	4. 巻 5 supplement-1
2. 論文標題 Molecular Background of Estrogen-dependent and -independent Gene Expressions in Endometriotic Lesions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Endocr Soc	6. 最初と最後の頁 A770
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/jendso/bvab048.1566	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Masao Izawa, Fuminori Taniguchi
2. 発表標題 Diversity of Estrogen-Responsive Genes in Endometriotic Lesions
3. 学会等名 ENDO2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masao Izawa, Fuminori Taniguchi, Tasuku Harada
2. 発表標題 Hypomethylated CpG-rich sequences may function as an active enhancer in gene expressions characteristic of endometriotic lesions
3. 学会等名 9th ASIAN CONGRESS ON ENDOMETRIOSIS (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masao Izawa, Yukihiro Azuma, Fuminori Taniguchi, Tasuku Harada
2. 発表標題 Molecular background of retinoic acid receptor expression in endometriotic cells
3. 学会等名 9th ASIAN CONGRESS ON ENDOMETRIOSIS (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Izawa M, Azuma Y, Taniguchi F, Harada T
2. 発表標題 Molecular Background of Estrogen-dependent and -independent Gene Expressions in Endometriotic lesions
3. 学会等名 ENDO2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masao Izawa, Yukihiro Azuma, Naohiro Hori, Fuminori Taniguchi, Tasuku Harada
2. 発表標題 Estrogen-Responsive and -Unresponsive Gene Expressions Promoted by Enhancers Specifically Hypomethylated in Endometriotic Cells May Become a Molecular Marker in Endometriosis Lesions
3. 学会等名 ENDO2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊澤正郎, 谷口 文紀, 原田 省
2. 発表標題 子宮内膜症細胞のアロマターゼ遺伝子上流に見出した脱メチル化領域の活性型エンハンサー機能
3. 学会等名 第92回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊澤正郎 谷口文紀 原田省
2. 発表標題 子宮内膜症細胞に特徴的な低メチル化により活性化されたGATA6遺伝子エンハンサー
3. 学会等名 第41回日本エンドメトリーシス学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------